

Preclinical studies on the immune-modulatory effects of dietary oligosaccharides

Citation for published version (APA):

Vos, A. (2008). Preclinical studies on the immune-modulatory effects of dietary oligosaccharides. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Pre- and probiotics receive much attention nowadays with regard to their health-promoting and immune-modulatory properties. In literature, the oligosaccharides in breast milk have been described as the first prebiotic agents that newborns encounter in life, due to their stimulative effect on the number of bifidobacteria in the infant's large intestine. Because there are situations in which it is not possible or preferable to breast-feed infants, it is important that there are infant milk formulas that offer the best possible functional alternative. With this goal, an oligosaccharide concept was previously developed (Immunofortis) for application in infant milk formulas. This mixture, consisting of short-chain galactooligosaccharides and long-chain fructooligosaccharides in a 9:1 ratio (scGOS/lcFOS), was shown to have a similar bifidogenic effect on the composition of the microbiota in infants as breast milk.

Not only do the intestinal microbiota play an important role in digestion, they also interact with cells of the immune system. Moreover, correlations have been described in literature between breast feeding and/or the intestinal microbiota on the one hand, and the incidence of infections and atopic reactions on the other hand. For these reasons, the hypothesis was proposed that specific mixtures of oligosaccharides, based on the scGOS/lcFOS mixture, might induce immune-modulatory effects, leading to a reduction in the incidence of infections and atopic reactions.

The specific goal of the work described in this thesis was to investigate the immune-modulatory effects of specific mixtures of oligosaccharides that are suitable for application in infant nutrition. To reach this goal, animal studies and a limited number of *in vitro* experiments have been carried out, with a focus on functional changes in the immune system and the consistency of these effects in multiple mouse models. The existing literature on immune-modulatory effects of oligosaccharides and other non-digestible carbohydrates (NDC) was reviewed broadly in chapter 2. One of the important findings was that there are indications for direct, microbiota-independent immune-modulatory effects of NDC, in addition to the more widely accepted microbiota-dependent immunological effects. However, the amount of publications that focus on the underlying mechanism of observed immune-modulatory effects is very limited. Therefore, an attempt was made in this thesis to gain more insight into this mechanism by studying correlations between effects on the microbiota and the immune system, as well as by performing a limited number of *in vitro* experiments.

In order to study the immunological effects of specific mixtures of oligosaccharides, an influenza vaccination model was set up in C57BL/6 mice (chapter 3). The vaccination response in this model was regarded to be representative of the functional status of the immune system in general. The delayed-type hypersensitivity (DTH) response, an *in vivo* T-helper1 (Th1) dependent immune response, was the most important parameter in this model, but additional immunological and microbiological parameters were quantified as well.

Addition of scGOS/lcFOS to the diets, in amounts that are relevant for application in infant nutrition, led to significantly increased DTH responses after vaccination. Other oligosaccharides did not induce this effect, showing a degree of specificity in the immunological effects of dietary oligosaccharides. Increases in the percentages of bifidobacteria and lactobacilli were observed in mice with increased DTH responses, but the inverse relationship was not always found. This suggests that a prebiotic effect alone is not sufficient for the immunological effect (chapter 3).

The results of chapter 4 correspond well with these findings. In addition to the scGOS/lcFOS concept, pectin-derived acidic oligosaccharides (pAOS) were tested in the vaccination model. When pAOS was added as a single component to the diet, a significant dose-dependent increase in DTH response was observed, as well as a decrease in *ex-vivo* Th2 cytokine production. However, no significant changes were observed on the microbiological parameters in these mice. A combination of pAOS and scGOS/lcFOS led to a large increase in DTH response that suggested a form of synergy, which was accompanied by an increase in bifidobacteria and lactobacilli in the feces. Overall, the results chapters 3 and 4 are consistent with an oligosaccharide-induced shift in the Th1/Th2 balance towards Th1-mediated immunity in C57BL/6 mice. Since Th1 responses are weak in early life, these results are promising for applications in infant nutrition, with the goal to reduce the incidence of allergies and increase resistance to infections.

Additional vaccination experiments are described in chapter 5, in which the relationship between the effects on the microbiota composition and the immune system was studied. In an initial experiment, the timing of scGOS/lcFOS/pAOS supplementation relative to the vaccination schedule was varied. The results indicated that it is necessary to start supplementation before the first vaccination, in order to obtain a significant increase in DTH response to vaccination. However, supplementation during the second half of the vaccination schedule is not necessary for this effect to occur. These results strongly suggest that the oligosaccharide-induced immune-modulatory effect occurs during the priming phase of the immune response.

Subsequently, a shortened vaccination experiment was performed to study the correlation between microbiological and immunological parameters shortly after priming. Multiple regression analysis revealed a significant correlation of the DTH response with the percentage of lactobacilli in the cecum, even independently from the oligosaccharide supplementation. Yet, this correlation was not strong and the results suggest that other, unanalyzed parameters played a role as well.

A limited set of *in vitro* experiments is described in chapter 6. The goal of these experiments was to find evidence for microbiota-independent immune-modulatory effects of the oligosaccharides that had been studied *in vivo*. No evidence was found for such effects on parameters of human T cell function, NK-activity or dendritic cell maturation. However, the lack of evidence in this limited set of experiments does not provide definite proof that microbiota-independent effects of these oligosaccharides do not occur.

In addition to the murine vaccination experiments, disease-specific animal models have been used to study the immune-modulatory effects of the specific mixtures of oligosaccharides. The effects of scGOS/lcFOS/pAOS in a murine cytomegalovirus (MCMV) model is described in chapter 7. It was found that the viral load was significantly reduced in multiple organs early after infection in supplemented animals (C57BL/6) compared to controls. Together with the lower incidence of detectable infectious virus in the liver and increasing trends in interferon- α and $-\gamma$, these data suggest that the oligosaccharides stimulate innate immunity and NK-activity, leading to a reduction in early virus replication. No major effects were observed on MCMV-specific DTH responses in C57BL/6 mice. In BALB/c mice, no significant effects were observed on viral parameters or DTH responses.

It is well-known that BALB/c mice are more Th2-prone than C57BL/6 mice. Therefore, the specific mixtures of scGOS/lcFOS and pAOS were tested in an ovalbumin (OVA)-induced model of respiratory allergy, to test the effects on a Th2-related immune response. Supplementation with both scGOS/lcFOS and scGOS/lcFOS/pAOS resulted in significant decreases of respiratory allergy-related parameters, which appeared to be more pronounced in the latter supplementation group. These results show that the immunological effects of specific oligosaccharide mixtures in BALB/c mice are consistent with a shift in the Th1/Th2 balance towards Th1-related immunity, leading to a decrease in the magnitude of Th2 responses.

In chapter 9 a novel concept for infant nutrition, consisting of multiple potentially immune-modulatory ingredients, was tested in the influenza vaccination model. Poly-

unsaturated fatty acids (PUFA) were part of this concept, because of the beneficial effects on the development of allergies and other parameters that have been described in literature. However, it has also been reported *n*-3 PUFAs can suppress Th1-related immune parameters. Therefore, the net effect of the total combination of ingredients was studied, to ascertain that the effects of separate ingredients would not cancel each other out. Unexpectedly, a combination of low doses of *n*-3 and *n*-6 PUFAs, as well as *n*-3 PUFAs alone led to a significant increase in the DTH response after vaccination. The effect of supplementation with a specific mixture of oligosaccharides induced a larger increase in DTH response, comparable in magnitude to the effect of the total combination of ingredients. These results show that, similar to the effects of the specific oligosaccharide mixtures, the total concept holds promise for reducing the incidence of allergies and increased resistance to infections in infants.

In conclusion, the results in this thesis show that dietary supplementation with combinations of scGOS, lcFOS and pAOS induces systemic immune-modulatory effects in multiple mouse models. These immunological effects are consistent with a shift in the Th1/Th2 balance towards Th1-related immunity, although the results in the MCMV model suggest a stimulation of NK-activity as well. Many questions regarding the precise mechanism behind the immune-modulatory effects have not been answered in this thesis. Additional research is recommended to investigate the potential role of NKT or other regulatory cells in the observed effects, as well as the biological relevance of microbiota-independent effects on the immune system.

The results from clinical studies with scGOS/lcFOS-supplemented infants, in combination with the results in this thesis, show the consistency of the oligosaccharide-induced immunological and microbiological effects in mice and man. The observed reduction in infection- and atopy-related parameters in scGOS/lcFOS-supplemented infants suggests that the application of these oligosaccharides can contribute in a positive way to making infant nutrition more similar to breast milk from an immunological point of view. Additionally, the immunological effects of specific mixtures of oligosaccharides are promising for application in specific nutritional products for adult target groups, such as patient groups that suffer from the consequences of a reduced resistance to infection. Clinical trials with regard to this topic are currently being planned and executed.

Samenvatting

Pre- en probiotica staan tegenwoordig in de belangstelling vanwege de gezondheidsbevorderende en immuunmodulerende eigenschappen die eraan worden toegeschreven. Een belangrijke overeenkomst tussen deze voedingscomponenten is dat ze de samenstelling en/of het metabolisme van de micro-organismen (microbiota) in de darm beïnvloeden. De oligosacchariden in moedermelk zijn in de literatuur aangeduid als de eerste natuurlijke prebiotica die pasgeborenen in hun voeding kunnen tegenkomen, vanwege het stimulerende effect ervan op het aantal bifidobacteriën in de dikke darm. Omdat er situaties voorkomen waarin het niet mogelijk of wenselijk is om borstvoeding te geven aan zuigelingen, is het belangrijk dat er alternatieve zuigelingenvoedingen beschikbaar zijn die functioneel zoveel mogelijk gelijk zijn aan borstvoeding. Hiertoe is voorafgaand aan het werk hier beschreven een oligosaccharidenconcept ontwikkeld (Immunofortis, voorheen aangeduid met de afkorting GOS/FOS) voor toepassing in babyvoeding, waarvan is aangetoond dat het een soortgelijk stimulerend effect heeft op bifidobacteriën in zuigelingen als borstvoeding. Dit concept omvat een mix van korte-keten galacto-oligosacchariden en lange-keten fructo-oligosacchariden in een verhouding van 9:1 (scGOS/lcFOS).

De microbiota in de darm spelen niet alleen een belangrijke rol in de menselijke spijsvertering, maar interacteren ook met cellen van het immuunsysteem, waarvan een groot deel in en rond de darmen gelocaliseerd is. In de literatuur zijn er verbanden beschreven tussen borstvoeding en/of de samenstelling van de microbiota enerzijds en het optreden van infecties en allergische reacties anderzijds. Om deze redenen is de hypothese gevormd dat specifieke mengsels van oligosacchariden, gebaseerd op het scGOS/lcFOS concept, mogelijk immuunmodulerende effecten kunnen hebben die resulteren in een vermindering van het ontstaan van allergische reacties en een verhoging van de weerstand tegen infecties.

Het specifieke doel van het werk in dit proefschrift was het onderzoeken van de immuunmodulerende eigenschappen van specifieke oligosaccharidenmengsels die kunnen worden toegepast in zuigelingenvoeding. In dit kader zijn dierstudies en een beperkt aantal *in vitro* experimenten uitgevoerd. De nadruk lag hierbij op het onderzoeken van functionele veranderingen in het immuunsysteem en op de consistentie van deze effecten in verschillende muismodellen. In hoofdstuk 2 is een brede inventarisatie van de literatuur over immuunmodulerende eigenschappen van verschillende oligosacchariden en andere vezels beschreven. Hieruit is onder meer gebleken dat er niet alleen aanwijzingen zijn voor indirecte immunologische effecten

die worden geïnduceerd via veranderingen in de microbiota, maar ook voor directe, microbiota-onafhankelijke effecten. Er zijn echter maar weinig studies gepubliceerd waarin het onderliggende werkingsmechanisme specifiek is onderzocht. Daarom is er in dit proefschrift ook aandacht besteed aan het werkingsmechanisme dat ten grondslag ligt aan de immunologische effecten, door de correlatie te bestuderen tussen de effecten op het immuunsysteem en de veranderingen in de microbiota, en door verkennende *in vitro* experimenten uit te voeren.

Om de immunologische effecten van scGOS/lcFOS en andere oligosaccharidenmengsels te testen is een influenza vaccinatiemodel opgezet in C57BL/6 muizen (hoofdstuk 3). Hierbij is de vaccinatie beschouwd als een model-immuunrespons, die is gebruikt als uitleessysteem voor de algemene status van het immuunsysteem in de muizen. Een belangrijke parameter in dit model is de vertraagd-type overgevoeligheidsreactie (DTH respons) die specifiek is voor het vaccin en *in vivo* gemeten wordt. Deze DTH respons is een T-helper1 (Th1) gemedieerde immuunreactie, een type afweerreactie die van belang is voor de cellulaire immuniteit, zoals de afweer tegen virussen. Th1 reacties staan in balans met T-helper2 (Th2) responsen, die onder andere een rol spelen bij (het ontstaan van) allergieën. Omdat Th1 responsen vlak na de geboorte nog slecht ontwikkeld zijn, is de Th1/Th2 balans in het vroege leven verschoven richting Th2 reacties. In het vaccinatiemodel zijn er naast DTH responsen en additionele immunologische parameters ook microbiologische parameters gemeten in de muizen, om de relatie tussen deze parameters te onderzoeken.

Toevoeging van het scGOS/lcFOS mengsel aan het muizendieet, in hoeveelheden die relevant zijn voor toepassing in babyvoeding, veroorzaakte een significante verhoging van de DTH respons na vaccinatie. Vergelijkbare doses van andere oligosacchariden vertoonden dit effect niet, waaruit kan worden opgemaakt dat de immunologische effecten van verschillende oligosacchariden een mate van specificiteit vertonen. De toename in DTH respons ging gepaard met een toename van het percentage bifidobacteriën en lactobacillen in de feces. Echter, de omgekeerde relatie bleek niet in alle gevallen meetbaar te zijn. Dit suggereert dat een prebiotisch effect alleen niet voldoende (sufficient) is voor het veroorzaken van een immunologisch effect (hoofdstuk 3).

Ook bevindingen in hoofdstuk 4 zijn hiermee in overeenstemming. In uitbreiding op het scGOS/lcFOS oligosaccharidenconcept zijn er van pectine afgeleide zure oligosacchariden (pAOS) getest in het vaccinatiemodel. Als enkele toevoeging aan het dieet induceerde pAOS een significante dosis-afhankelijke toename in de DTH respons, zonder dat er een significant effect op de microbiologische parameters kon worden

gemeten. Consistent met een verschuiving in de Th1/Th2 balans werd er in dit experiment naast een verhoogde (Th1-afhankelijke) DTH respons ook een verlaagde *ex vivo* productie van Th2 cytokines gemeten door vaccin-gestimuleerde miltcellen. Een combinatie van pAOS met scGOS/lcFOS gaf een onverwacht grote verhoging van de DTH respons, hetgeen een vorm van synergie suggereert en samen ging met een verhoging van het percentage bifidobacteriën en lactobacillen in de feces na 6 weken oligosaccharidensuppletie. Samengenomen zijn de resultaten van hoofdstukken 3 en 4 consistent met een verschuiving in de Th1/Th2 balans richting Th1-gemedieerde responsen, veroorzaakt door combinaties van scGOS/lcFOS met of zonder pAOS. Vanwege de slecht ontwikkelde Th1-responsen in het vroege leven zijn deze resultaten veelbelovend voor toepassing in babyvoeding, met het doel om het ontstaan van allergieën en het optreden van infecties te verminderen.

Om de relatie tussen de effecten op de microbiota en het immuunsysteem verder te bestuderen zijn er vaccinatie-experimenten uitgevoerd met het oligosaccharidenmengsel dat het meest effectief bleek in het verhogen van de DTH-respons na vaccinatie: scGOS/lcFOS in combinatie met pAOS (hoofdstuk 5). Allereerst is de timing van de oligosaccharidensuppletie gevarieerd ten opzichte van het vaccinatieschema. De resultaten gaven aan dat suppletie voorafgaand aan de primaire vaccinatie noodzakelijk is voor een significant verhoogde DTH respons aan het einde van het zes-weekse vaccinatieschema. Anderzijds is suppletie gedurende de tweede helft van het vaccinatieschema hiervoor niet noodzakelijk gebleken; een sterke aanwijzing voor het optreden van de oligosacchariden-geïnduceerde modulatie tijdens de primingsfase van de immuunrespons. Om zo kort mogelijk na de primingsfase de correlatie tussen de microbiologische en immunologische effecten te kunnen meten, is een verkort vaccinatie-experiment uitgevoerd met hetzelfde oligosaccharidenmengsel. Uit multiple-regressie analyse van de DTH resultaten tegen verschillende microbiologische parameters bleek dat het percentage lactobacillen in het cecum een significante correlatie vertoonde met de DTH-respons, zelfs onafhankelijk van de oligosaccharidensuppletie. Evenwel was de correlatie niet heel sterk en duiden de resultaten tevens op een rol van andere, niet analyseerde parameters.

In hoofdstuk 6 staan verschillende *in vitro* studies beschreven waarin gezocht is naar microbiota-onafhankelijke effecten van oligosacchariden op cellen van het immuunsysteem. Hiertoe zijn verschillende typen humane immuuncellen direct geïncubeerd met oligosacchariden. In perifeer bloed mononucleaire cellen (een mengsel van voornamelijk monocysten, T, B en natural killer (NK) cellen) zijn geen functionele verschillen gevonden in parameters van T cel functie en NK-activiteit. Ook zijn er geen

effecten gevonden op parameters van dendritische cel maturatie. Echter, het feit dat er geen aanwijzingen zijn gevonden vormt vanzelfsprekend geen bewijs voor de totale afwezigheid van microbiota-onafhankelijke immunologische effecten.

Naast de influenza vaccinatie-experimenten zijn de oligosaccharidenmengels ook in ziekte-specifieke diermodellen getest, om de functionele effecten van suppletie op parameters van virusinfecties en allergieën te testen. In hoofdstuk 7 zijn de resultaten beschreven van suppletie met een combinatie van scGOS/lcFOS en pAOS in een murine cytomegalovirus (MCMV) infectiemodel, zowel in C57BL/6 als in BALB/c muizen. In C57BL/6 muizen bleek de virusload kort na infectie in meerdere organen significant lager te zijn in gesuppleerde dieren dan in controledieren. Tevens was het aantal dieren met een meetbare hoeveelheid infectieus virus in de lever op verschillende dagen na infectie verlaagd in de gesuppleerde groep. In deze groep werd ook een trend waargenomen van verhoogde interferon- α en γ concentraties in het serum. Dit zou kunnen duiden op een verhoogde activiteit van het 'innate' immuunsysteem, resulterend in een verhoging van de NK-activiteit en een remming van vroege virusreproductie. Er zijn geen grote verschillen gevonden in virus-specifieke DTH responsen. In tegenstelling tot de resultaten in C57BL/6 muizen zijn er in BALB/c muizen geen significante effecten van de oligosacchariden-suppletie waargenomen in dit model.

Het is bekend dat er immunologische verschillen bestaan tussen C57BL/6 en BALB/c muizen; de eerstgenoemden zijn goede Th1-responders en de laatstgenoemden zijn betere Th2-responders. Om te onderzoeken of effecten in BALB/c muizen wel consistent zijn met de eerder gevonden verschuiving in de Th1/Th2 balans, zijn de oligosacchariden in het ovalbumine-geïnduceerde allergische astma model in BALB/c muizen getest (hoofdstuk 8), waarin Th2-responsen een grote rol spelen. In dit model induceerden scGOS/lcFOS en scGOS/lcFOS/pAOS een significante remming op verschillende allergie-gerelateerde luchtwegparameters. Ook werd er een trend waargenomen van verlaagde ovalbumine-specifieke immunoglobuline E concentraties in het serum. De resultaten suggereerden dat het allergie-remmende effect van scGOS/lcFOS/pAOS sterker was dan van scGOS/lcFOS, echter, door de opzet van de studies kon deze vergelijking niet direct worden gemaakt. Tezamen tonen deze resultaten aan dat de immunologische effecten van de specifieke oligosaccharidenmengels in BALB/c muizen consistent zijn met een verschuiving in de Th1/Th2 balans richting Th1, waarbij Th2 responsen worden geremd.

Als laatste is een nieuw te ontwikkelen babyvoeding-concept getest in het influenza vaccinatiemodel (hoofdstuk 9), bestaande uit meerdere potentieel immuunmodulerende stoffen. Meervoudig onverzadigde vetzuren (PUFA) maakten deel uit van dit concept, waarvan in de literatuur gunstige effecten op de ontwikkeling van allergieën en andere parameters zijn beschreven. Echter, van *n*-3 ('omega-3') PUFA's is ook gerapporteerd dat ze een onderdrukkende werking kunnen hebben op Th1-responsen. Daarom is het netto effect van de totale combinatie van ingrediënten bestudeerd, om te controleren of de afzonderlijke componenten elkaars werking niet (deels) zouden opheffen. Enigszins onverwacht leidde dieetsuppletie met lage doses van een combinatie van *n*-3 en *n*-6 PUFA's, of met *n*-3 PUFA's alleen tot een significant verhoogde DTH respons na vaccinatie. Het effect van oligosaccharidensuppletie leidde tot een groter effect op de DTH respons, vergelijkbaar met de combinatie van alle ingrediënten tezamen. Deze resultaten tonen aan dat het nieuwe concept veelbelovend is voor de ontwikkeling van een nieuwe babyvoeding, met het specifieke doel om de weerstand tegen infecties te verhogen en het ontstaan van allergieën tegen te gaan.

In totaliteit leiden de resultaten in dit proefschrift tot de conclusie dat dieetsuppletie met combinaties van scGOS, lcFOS en pAOS systemische immuunmodulerende effecten veroorzaakt in meerdere experimentele diermodellen. Deze immunologische effecten zijn consistent met een verschuiving in de Th1/Th2 balans richting Th1-responsen, al wijzen de resultaten in het MCMV-model tevens in de richting van een stimulatie in NK-activiteit. Aan het einde van dit proefschrift blijven veel vragen over het precieze werkingsmechanisme achter de immunologische effecten onbeantwoord. Additioneel onderzoek wordt aanbevolen om te onderzoeken of NKT-cellen of andere regulerende cellen hierbij betrokken zijn en of microbiota-onafhankelijke effecten op het immuunsysteem een rol spelen.

De resultaten uit klinische studies met scGOS/lcFOS gesuppleerde zuigelingen, in combinatie met de resultaten uit dit proefschrift, tonen de consistentie aan van oligosacchariden-geïnduceerde effecten in mens en dier, zowel in immunologisch als microbiologisch opzicht. De vermindering in het aantal infectie- en allergie-gerelateerde parameters die is waargenomen in scGOS/lcFOS-gesuppleerde zuigelingen suggereert dat toepassing hiervan kan bijdragen aan het maken van babyvoeding die in immunologisch opzicht meer op borstvoeding lijkt. Tevens zijn de immunologische effecten van oligosacchariden veelbelovend voor toepassing in specifieke voedingen voor volwassenen, bijvoorbeeld voor specifieke patiëntgroepen waarin de immuunfunctie ondersteund dient te worden. Klinische studies op dit gebied worden op dit moment gepland en uitgevoerd.